

日本国特許庁

JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP03/05487

28.04.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 7月17日

出願番号

Application Number:

特願2002-208305

[ST.10/C]:

[JP2002-208305]

出願人

Applicant(s):

アークレイ株式会社

REC'D 20 JUN 2003

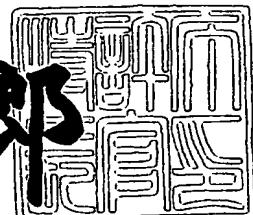
WIPO PCT

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 6月 2日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田 信一郎



出証番号 出証特2003-3042082

Best Available Copy

【書類名】 特許願

【整理番号】 R6819

【提出日】 平成14年 7月17日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12Q 1/26

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町57番地 アークレイ  
株式会社内

【氏名】 米原 聰

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町57番地 アークレイ  
株式会社内

【氏名】 石丸 香

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町57番地 アークレイ  
株式会社内

【氏名】 平井 香

【特許出願人】

【識別番号】 000141897

【氏名又は名称】 アークレイ株式会社

【代理人】

【識別番号】 110000040

【氏名又は名称】 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ

【代表者】 池内 寛幸

【電話番号】 06-6135-6051

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 139757

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0107559

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 スルホン酸化合物を用いたタンパク質の分解方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 タンパク質をスルホン酸化合物の存在下においてプロテアーゼ処理することによって、前記タンパク質を分解する方法。

【請求項2】 糖化タンパク質を含む試料をスルホン酸化合物の存在下においてプロテアーゼ処理することによって、前記糖化タンパク質を分解し、得られた糖化タンパク質分解物の糖化部分とフルクトシルアミノ酸オキシダーゼとを反応させ、この酸化還元反応を測定することによって、前記糖化タンパク質の量を測定する糖化タンパク質の測定方法。

【請求項3】 スルホン酸化合物およびニトロ化合物の存在下においてプロテアーゼ処理する請求項2記載の測定方法。

【請求項4】 スルホン酸化合物が、ラウリル硫酸ナトリウム(SLS)、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム(SDBS)、ラウリル硫酸リチウム(LiLS)、4-アミノアゾベンゼン-4'-スルホン酸ナトリウム(ABSA)、4-アミノ-4'-ニトロスチルベン-2,2'-ジスルホン酸2ナトリウム(ANDS)および4,4'-ジアゾスチルベンゼン-2,2'-ジスルホン酸2ナトリウム(DADS)からなる群から選択された少なくとも一つの化合物である請求項2または3記載の測定方法。

【請求項5】 プロテアーゼが、メタロプロテナーゼである請求項2~4のいずれか一項に記載の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、タンパク質を分解する方法、および試料中の糖化タンパク質をプロテアーゼで処理し、前記糖化タンパク質の量を酸化還元反応を用いて測定する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来から、試料中の目的のタンパク質（ペプチドを含む）を検出したり、測定に影響を与えるタンパク質の機能を失活させるために、前記タンパク質をプロテアーゼで分解する方法が、各種測定方法等において適用されている。

## 【0003】

例えば、糖尿病診断や治療等における重要な指標となる血球中の糖化タンパク質、特に生体血糖値の過去の履歴を反映している赤血球中の糖化ヘモグロビンを、酵素法により測定することが現在試みられており、その際にも糖化タンパク質をプロテアーゼ分解する方法が適用されている。前記酵素法では、溶血試料中の糖化タンパク質の糖化部分にフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ（以下、「F A O D」という）を作用させ、過酸化水素を発生させる。この過酸化水素量は、前記糖化タンパク質量に対応する。そして、このF A O D処理後の前記試料に、ペルオキシダーゼ（以下、「P O D」という）および酸化により発色する基質を添加し、前記P O Dを触媒として前記過酸化水素と前記基質との間で酸化還元反応させる。この時、前記基質が、酸化によって発色するため、その発色の測定により前記過酸化水素量を測定でき、この結果、試料中の糖化タンパク質量を知ることができる。

## 【0004】

しかし、前記糖化部分に作用させるF A O Dは、糖化タンパク質や糖化ペプチドよりも、糖化アミノ酸や、より短いペプチド断片に作用し易い。そこで、予め、糖化タンパク質をプロテアーゼで分解し、F A O Dを糖化部分に作用し易くすることによって、測定精度の向上を図っている。

## 【0005】

## 【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、プロテアーゼは基質特異性を有し、処理する基質によって分解活性が異なるため、目的のタンパク質の種類によっては、分解に長時間を要し、測定を迅速に行うことができないという問題がある。さらに、前記糖化タンパク質のように、目的のタンパク質が糖化されている場合は、その立体障害等により分解し難い場合もある。このような理由から、例えば、前述のような糖化タンパク質の測定においても、予め行うプロテアーゼ処理のために、測定全体に時間が

かかってしまう。このため、臨床検査等の分野における利用の点からも、前記糖化タンパク質の測定をより迅速に行える方法が求められている。

## 【0006】

そこで、本発明の目的は、迅速かつ優れた効率で、タンパク質を分解する方法、試料中の糖化タンパク質を分解し、前記糖化タンパク質量を測定する方法の提供である。

## 【0007】

## 【課題を解決するための手段】

前記目的を達成するために、本発明は、タンパク質をスルホン酸化合物の存在下においてプロテアーゼ処理することによって、前記タンパク質を分解する方法である。なお、本発明において「タンパク質」とは、ペプチドも含む。

## 【0008】

このように、プロテアーゼ処理をスルホン酸化合物の存在下で行えば、試料中のタンパク質の分解を迅速に行うことができる。

## 【0009】

前記目的を達成するために、本発明の糖化タンパク質の測定方法は、糖化タンパク質を含む試料をスルホン酸化合物の存在下においてプロテアーゼ処理することによって、前記糖化タンパク質を分解し、得られた糖化タンパク質分解物の糖化部分とFAODとを反応させ、この酸化還元反応を測定することによって、前記糖化タンパク質の量を測定する方法である。なお、本発明において、「糖化タンパク質」とは、糖化ペプチドも含む。

## 【0010】

従来のスルホン酸化合物の非存在下での方法においては、プロテアーゼにより糖化タンパク質を十分に分解し、FAODを糖化部分に作用し易くするためには、例えば、約6～40時間もプロテアーゼ処理する必要があった。このため、前記酵素法により糖化タンパク質を測定するには、長時間を要し、有用な方法とは言い難かった。しかし、本発明の測定方法によれば、短時間でタンパク質等を分解できるため、迅速に糖化タンパク質等の測定を行うことが可能である。本発明の測定方法によれば、例えば、スルホン酸化合物を添加する以外は同じ条件で測

定を行った場合、前記スルホン酸化合物の非存在下の場合に比べて、約10～2000倍の範囲で測定時間を短縮できる。このため、本発明の測定方法は、よりいっそう高精度な測定を実現できるため、前述のような臨床医療等における各種検査に有用である。

## 【0011】

## 【発明の実施の形態】

前述のように、本発明の測定方法は、糖化タンパク質を含む試料を、スルホン酸化合物の存在下においてプロテアーゼ処理することによって、前記糖化タンパク質を分解し、得られた糖化タンパク質分解物の糖化部分とFAODとを反応させ、この酸化還元反応を測定することによって、前記糖化タンパク質の量を測定する方法である。

## 【0012】

本発明において、前記スルホン酸化合物としては、例えば、

一般式  $R-SO_3X$

で表わされる化合物が使用できる。前記式において、Xは、例えば、Na、K、Li、H等、Rは、例えば、 $-(CH_2)_nCH_3$ 、 $-C_6H_4-(CH_2)_nCH_3$ 等が好ましい。前記Rにおけるnは、例えば、3～20の範囲である。また、Rは、疎水基を有することが好ましく、特に好ましくは置換フェニル基である。

## 【0013】

前記スルホン酸化合物の具体例としては、例えば、ラウリル硫酸ナトリウム（以下、「SLS」という）、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム（以下、「SDS」という）、ラウリル硫酸リチウム（以下、「LiLS」という）、4-アミノアゾベンゼン-4'-スルホン酸ナトリウム（以下、「ABSA」という）、4-アミノ-4'-ニトロスチルベン-2,2'-ジスルホン酸2ナトリウム（以下、「ANDS」という）、4,4'-ジアゾスチルベンゼン-2,2'-ジスルホン酸2ナトリウム（以下、「DADS」という）等が使用でき、より好ましくは、SLS、SDS、LiLSである。

## 【0014】

これらのスルホン酸化合物は、一般的に溶解性に優れるため、試料中の糖化タンパク質の濃度が高濃度であっても処理が容易であり、また、コストの面でも低

価格であるため、非常に有用である。

## 【0015】

また、本発明の測定方法において、糖化タンパク質の分解がより一層促進できることから、スルホン酸化合物およびニトロ化合物の共存下でプロテアーゼ処理を行うことが好ましい。

## 【0016】

前記ニトロ化合物としては、特に制限されないが、例えば、ニトロベンゼン化合物やジニトロベンゼン化合物等があげられる。これらの化合物は、ベンゼン環がニトロ基の他に、例えば、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{SO}_3$ 、 $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$  ( $n = 2 \sim 9$ ) 等の置換基を有することが好ましく、これらの中でも親水基を置換基として有することが好ましい。

## 【0017】

前記ニトロ化合物の具体例としては、例えば、2,4-ジニトロフェノール (2,4-DNP)、p-ニトロフェノール (p-NP)、2,4-ジニトロアニリン (2,4-DNA)、p-ニトロアニリン (p-NA)、亜硝酸ナトリウム ( $\text{NaNO}_2$ )、亜硝酸カリウム ( $\text{KNO}_2$ )、4-アミノ-4'-ニトロスチルベン-2,2'-ジスルホン酸2ナトリウム (以下、「ANPS」という)、ニトロベンゼン等が使用できる。

## 【0018】

このようにスルホン酸化合物とニトロ化合物とを共存させる場合、これらの組み合わせは特に制限されない。

## 【0019】

本発明の測定方法において、前記スルホン酸化合物の添加量は、特に制限されず、例えば、プロテアーゼの種類および添加量、試料の種類、前記試料に含まれる糖化タンパク質の量等によって適宜決定できる。

## 【0020】

具体例としては、試料  $1 \mu\text{L}$  当たり、例えば、前記スルホン酸化合物を、0.01~1000  $\mu\text{mole}$  の範囲になるように添加することが好ましく、より好ましくは0.03~200  $\mu\text{mole}$  の範囲、特に好ましくは、0.05~40  $\mu\text{mole}$  の範囲である。

## 【0021】

また、スルホン酸化合物およびニトロ化合物を共存させる場合は、試料  $1 \mu l$  当たり、例えば、前記スルホン酸化合物  $0.005 \sim 20 \mu m o l$  の範囲、ニトロ化合物  $0.005 \sim 25 \mu m o l$  の範囲で添加することが好ましく、より好ましくはスルホン酸化合物  $0.02 \sim 4 \mu m o l$  の範囲、ニトロ化合物  $0.01 \sim 5 \mu m o l$  の範囲である。

## 【0022】

本発明の測定方法において、前記試料は、特に制限されないが、全血、血漿、血清、血球等の血液試料の他に、例えば、尿、髄液、唾液等の生体試料や、ジュース等の飲料水、醤油、ソース等の食品類等もあげられる。この中でも好ましくは、全血等の血液試料や血球試料である。

## 【0023】

本発明の測定方法において、前記分解する糖化タンパク質としては、例えば、糖化ヘモグロビン、糖化アルブミン等があげられ、この中でも好ましくは糖化ヘモグロビンである。血液中のヘモグロビンは、その濃度が約  $60 \sim 200 g/L$  と高く、また、分解が困難であったため、プロテアーゼ処理に数時間～数日かかっていたが、本発明の測定方法によれば、例えば、20秒～2時間でのプロテアーゼ処理が可能になり、糖化ヘモグロビンの測定を迅速に行うことができる。

## 【0024】

本発明の測定方法において、前記プロテアーゼは、特に制限されないが、例えば、セリンプロテアーゼ、チオールプロテアーゼ、メタロプロテアーゼ等が使用でき、具体的には、トリプシン、プロテナーゼK、キモトリプシン、パパイン、プロメライン、ズブチリシン、エラスターーゼ、アミノペプチダーゼ等が好ましい。また、前記分解する糖化タンパク質が糖化ヘモグロビンの場合、前記プロテアーゼは、前記糖化ヘモグロビンを選択的に分解するプロテアーゼであり、プロメライン、パパイン、ブタ臍臓由来トリプシン、メタロプロテイナーゼ、Bacillus subtilis 由来のプロテアーゼ等が好ましい。前記Bacillus subtilis 由来プロテアーゼとしては、商品名プロテアーゼN（例えば、フルカ社製）、商品名プロテアーゼN「アマノ」（天野製薬社製）等があげられる。前記メタロプロテイナーゼ

ゼとしては、Bacillus属由来メタロプロテイナーゼ (EC 3. 4. 24. 4) 等があげられる。これらの中でもより好ましくはメタロプロテイナーゼ、ブロメライン、パパインであり、特に好ましくはメタロプロテイナーゼである。このように、選択的に分解するプロテアーゼを使用すれば、特定の糖化タンパク質の分解物を選択的に調製できる。

## 【0025】

本発明の測定方法において、前記酸化還元反応の測定は、糖化タンパク質分解物または糖化ペプチド分解物の糖化部分と F A O D とを反応させることにより生じる過酸化水素量の測定であることが好ましい。この過酸化水素量の測定は、例えば、P O D 等の酸化酵素と、酸化により発色する基質（以下、「発色基質」という）とを用いて測定することができる。

## 【0026】

前記発色基質としては、特に制限されないが、例えば、以下に示すような発色基質が使用できる。これらの発色基質は、通常、400 nm 以上に吸収を持つが、前述のようなスルホン酸化合物やニトロ化合物は、一般的に400 nm 以上に吸収を持たないため、このような発色基質と併に使用しても、測定に誤差が生じるおそれがないためである。

## 【0027】

前記発色基質の具体例としては、例えば、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミンナトリウム（以下、「DA-64」という）、トリンダー試薬と4-アミノアンチピリンとの組み合せ、N,N,N',N',N',N'-ヘキサ(3-スルホプロピル)-4,4',4''-トリアミノトリフェニルメタン ヘキサソデイウム塩（以下、「TPM-PS」という）、N,N,N',N',N',N'-ヘキサ(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-4,4',4''-トリアミノトリフェニルメタン ヘキサソデイウム塩（以下、「TPM-OS」という）、10-(カルボキシメチルアミノカルボニル)3,7-ビス(ジメチルアミノ)フェノチアジンナトリウム塩（以下、「DA-67」という）、10-(メチルアミノカルボニル)3,7-ビス(ジメチルアミノ)フェノチアジンナトリウム塩（以下、「MCDP」という）、10-(カルボキシアミノメチル-4-ベンソアミノカルボニル)3,7-ビス(ジメチルアミノ)フェノチアジンナトリウム塩（以下、「MMX」という）等があげられる。これらの中でも、例えば、トリアミノトリフェニルメタン系の発色基質が好ましい。

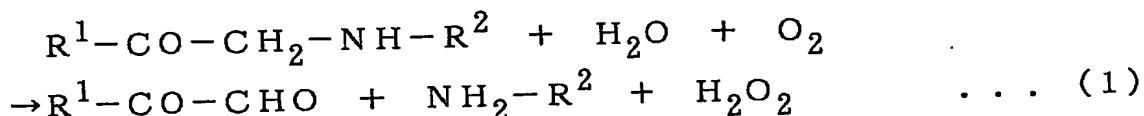
## 【0028】

前記トリンダー試薬としては、例えば、フェノール、フェノール誘導体、アニリン誘導体、ナフトール、ナフトール誘導体、ナフチルアミン、ナフチルアミン誘導体等があげられる。また、前記トリンダー試薬と組み合わせる化合物としては、前記4-アミノアンチピリンの他に、例えば、アミノアンチピリン誘導体、バニリンジアミンスルホン酸、メチルベンズチアゾリノンヒドラゾン（MBTH）、スルホン化メチルベンズチアゾリノンヒドラゾン（SMBTH）等も使用できる。

## 【0029】

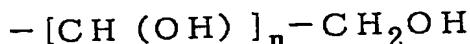
本発明において、前記FAODとしては、下記式（1）に示す反応を触媒するFAODであることが好ましい。

## 【0030】



## 【0031】

前記式（1）において、 $R^1$ は、水酸基もしくは糖化反応前の糖に由来する残基（糖残基）を示す。前記糖残基（ $R^1$ ）は、反応前の糖がアルドースの場合はアルドース残基であり、反応前の糖がケトースの場合、ケトース残基である。例えば、反応前の糖がグルコースの場合は、アマドリ転位により、反応後の構造はフルクトース構造をとるが、この場合、糖残基（ $R^1$ ）は、グルコース残基（アルドース残基）となる。この糖残基（ $R^1$ ）は、例えば、



で示すことができ、 $n$ は、0～6の整数である。

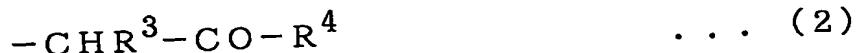
## 【0032】

前記式（1）において、 $R^2$ は、特に制限されないが、例えば、糖化アミノ酸、糖化ペプチドまたは糖化タンパク質の場合、 $\alpha$ -アミノ基が糖化されている場合と、それ以外のアミノ基が糖化されている場合とで異なる。

## 【0033】

前記式（1）において、 $\alpha$ -アミノ基が糖化されている場合、 $R^2$ は、下記式（2）で示すアミノ酸残基またはペプチド残基である。

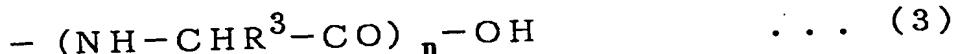
## 【0034】



## 【0035】

前記式(2)において、 $\text{R}^3$ はアミノ酸側鎖基を示す。また、 $\text{R}^4$ は水酸基、アミノ酸残基またはペプチド残基を示し、例えば、下記式(3)で示すことができる。下記式(3)において、 $n$ は、0以上の整数であり、 $\text{R}^3$ は、前述と同様にアミノ酸側鎖基を示す。

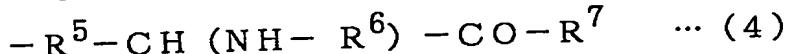
## 【0036】



## 【0037】

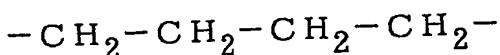
また、前記式(1)において、 $\alpha$ -アミノ基以外のアミノ基が糖化されている(アミノ酸側鎖基が糖化されている)場合、 $\text{R}^2$ は下記式(4)で示すことができる。

## 【0038】



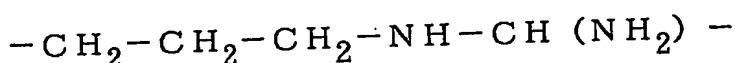
## 【0039】

前記式(4)において、 $\text{R}^5$ は、アミノ酸側鎖基のうち、糖化されたアミノ基以外の部分を示す。例えば、糖化されたアミノ酸がリジンの場合、 $\text{R}^5$ は



であり、

例えば、糖化されたアミノ酸がアルギニンの場合、 $\text{R}^5$ は、

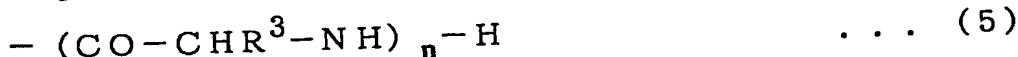


である。

## 【0040】

また、前記式(4)において、 $\text{R}^6$ は、水素、アミノ酸残基またはペプチド残基であり、例えば、下記式(5)で示すことができる。なお、下記式(5)において、 $n$ は0以上の整数であり、 $\text{R}^3$ は、前述と同様にアミノ酸側鎖基を示す。

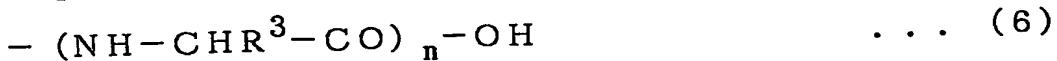
## 【0041】



## 【0042】

また、前記式(4)において、R<sup>7</sup>は、水酸基、アミノ酸残基またはペプチド残基であり、例えば、下記式(6)で示すことができる。なお、下記式(6)において、nは0以上の整数であり、R<sup>3</sup>は、前述と同様にアミノ酸側鎖基を示す。

## 【0043】



## 【0044】

## (実施形態1)

本発明の糖化タンパク質の測定方法について、測定対象物が血球中の糖化タンパク質である例をあげて説明する。

## 【0045】

まず、全血をそのまま溶血し、または全血から遠心分離等の常法により血球画分を分離してこれを溶血し、溶血試料を調製する。この溶血方法は、特に制限されず、例えば、界面活性剤を用いる方法、超音波による方法、浸透圧の差を利用する方法等が使用でき、この中でも前記界面活性剤を用いる方法が好ましい。

## 【0046】

溶血用の界面活性剤としては、特に制限されないが、例えば、ポリオキシエチレン-p-t-オクチルフェニル エーテル (Triton系界面活性剤等)、ポリオキシエチレン ソルビタン アルキル エステル (Tween系界面活性剤等)、ポリオキシエチレン アルキル エーテル (Brij系界面活性剤等)等の非イオン性界面活性剤が使用でき、具体的には、例えば、商品名Triton X-100、商品名Tween-20、商品名Brij 35等があげられる。前記界面活性剤による処理条件は、通常、処理溶液中の血球濃度が1~10体積%の場合、前記処理溶液中の濃度が0.1~1重量%になるように前記界面活性剤を添加し、室温で5秒~1分程度攪拌すればよい。

## 【0047】

また、前記浸透圧の差を利用する場合は、例えば、全血の体積に対し2~100倍体積量の精製水を添加して溶血できる。

## 【0048】

つぎに、前記溶血試料を、前記スルホン酸化合物存在下で前記プロテアーゼ処理することにより糖化タンパク質を分解し、糖化タンパク質分解物を調製する。このように糖化タンパク質をプロテアーゼで処理するのは、前述のように後の処理に使用する F A O D がタンパク質および長いポリペプチド鎖に作用し難いため、分解して糖化部分に作用し易くするためである。前述のように、スルホン酸化合物存在下でプロテアーゼ処理すれば、短時間で、かつ高い分解効率で糖化タンパク質を分解できるため、プロテアーゼ処理時間が短くても、F A O D は十分に糖化部分に作用できる。なお、より分解を促進できることから、後述するように、スルホン酸化合物およびニトロ化合物の存在下で処理してもよい。

## 【0049】

前記プロテアーゼ処理は、通常、緩衝液中で行われる。前記緩衝液の種類は、特に制限されず、例えば、トリス塩酸緩衝液、E P P S 緩衝液、P I P E S 緩衝液、リン酸緩衝液、A D A 緩衝液、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、グリシンアミド緩衝液、C H E S 緩衝液等が使用でき、そのpHは、pH 5~12の範囲が好ましく、より好ましくは6~10の範囲、特に好ましくは7~9の範囲である。

## 【0050】

前記プロテアーゼは、前述のように、例えば、プロテアーゼK、ズブチリシン、トリプシン、アミノペプチダーゼ等が使用できる。前記プロテアーゼの添加割合は、例えば、前処理溶液中の血球濃度が、0.1~10体積%の場合、プロテアーゼを0.1~100g/リットルの範囲になるように添加することが好ましく、より好ましくは0.3~50g/リットルの範囲、特に好ましくは0.5~20g/リットルの範囲である。

## 【0051】

また、分解する糖化タンパク質が糖化ヘモグロビンの場合、プロテアーゼは、前述のように、例えば、糖化ヘモグロビンを選択的に分解するプロテアーゼであり、前記プロテアーゼが、プロメライン、パパイン、ブタ臍臓由来トリプシン、メタロプロテイナーゼ、Bacillus subtilis由来のプロテアーゼであることが好ましい。これらのプロテアーゼの添加割合は、例えば、前処理溶液中の血球濃度

が、0.1~10体積%の場合、プロテアーゼを0.1~50g/リットルの範囲になるように添加することが好ましく、より好ましくは0.3~30g/リットルの範囲、特に好ましくは1~20g/リットルの範囲である。具体的には、プロテアーゼがメタロプロテイナーゼの場合、血球濃度0.3~5体積%の前処理溶液に、0.1~30g/リットルの範囲になるように添加することが好ましく、より好ましくは0.3~20g/リットルの範囲、特に好ましくは1~10g/リットルの範囲である。

## 【0052】

前記スルホン酸化合物の添加割合は、例えば、プロテアーゼ処理溶液中の血球濃度が、1体積%の場合、濃度0.0001~100mmol/リットルの範囲になるように添加することが好ましく、より好ましくは0.0003~60mmol/リットルの範囲、特に好ましくは0.001~30mmol/リットルの範囲である。具体的には、前記スルホン酸化合物がSLSであり、プロテアーゼ処理溶液中の血球濃度が、1体積%の場合、濃度0.1~100mmol/リットルの範囲になるように添加することが好ましく、より好ましくは0.2~60mmol/リットルの範囲、特に好ましくは0.5~30mmol/リットルの範囲である。

## 【0053】

前記スルホン酸化合物は、そのまま使用してもよいが、操作の簡便性や処理効率等の点から、溶媒に溶解したスルホン酸化合物化合物溶液として使用することが好ましい。前記溶液の濃度は、スルホン酸化合物の種類等により適宜決定でき、例えば、1~1000mmol/リットルの範囲である。前記溶媒としては、例えば、蒸留水、生理食塩水、緩衝液等が使用でき、前記緩衝液としては、例えば、前述の緩衝液等が使用できる。なお、前記スルホン酸化合物は、一種類でもよいし、二種類以上を併用してもよい。

## 【0054】

前記スルホン酸化合物存在下におけるプロテアーゼ処理の条件は、特に制限されないが、例えば、温度10~37℃の範囲、処理時間30秒~60分の範囲であり、好ましくは、温度20~37℃の範囲、処理時間30秒~10分の範囲である。

あり、より好ましくは、温度25～37℃の範囲、処理時間30秒～5分の範囲である。

## 【0055】

このようにスルホン酸化合物存在下で試料のプロテアーゼ処理を行えば、試料中の糖化タンパク質の分解を促進できるため、短時間で、かつ優れた分解効率で糖化タンパク質の分解物を得ることができる。

## 【0056】

また、このプロテアーゼ処理は、前述のようにスルホン酸化合物だけでなく、スルホン酸化合物とテトラソリウム化合物との共存下で行うことにより、さらにプロテアーゼによる分解を促進できる。

## 【0057】

ニトロ化合物の添加割合は、特に制限されず、例えば、スルホン酸化合物の添加量、プロテアーゼ量等に応じて適宜決定できるが、プロテアーゼ処理溶液中の血球濃度が、1体積%の場合、例えば、濃度0.01～25mmol/Lの範囲になるように添加することが好ましく、より好ましくは0.05～10mmol/Lの範囲である。

## 【0058】

つぎに、前記プロテアーゼ処理により得られた分解物を、前記FAODで処理する。このFAOD処理により、前記式(1)に示す反応が触媒される。

## 【0059】

このFAOD処理は、前記プロテアーゼ処理と同様に緩衝液中で行うことが好ましい。その処理条件は、使用するFAODの種類、測定対象物である糖化タンパク質の種類およびその濃度等により適宜決定される。

## 【0060】

具体的には、例えば、反応液中のFAOD濃度50～50,000U/L、反応液中の血球濃度0.01～1体積%、反応温度15～37℃、反応時間1～60分、pH6～9の範囲である。前記緩衝液の種類も特に制限されず、前記プロテアーゼ処理と同様の緩衝液が使用できる。

## 【0061】

つぎに、前記F A O D処理で生成した過酸化水素を、P O Dおよび前記発色性基質を用いて酸化還元反応により測定する。

## 【0062】

前記発色性基質としては、例えば、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミンナトリウム、オルトフェニレンジアミン(O P D)、トリンダー試薬と4-アミノアンチピリンとを組み合せた基質等があげられる。前記トリンダー試薬としては、例えば、フェノール、フェノール誘導体、アニリン誘導体、ナフトール、ナフトール誘導体、ナフチルアミン、ナフチルアミン誘導体等があげられる。また、前記4-アミノアンチピリンの他に、アミノアンチピリン誘導体、バニリンジアミンスルホン酸、メチルベンズチアゾリノンヒドラゾン(M B T H)、スルホン化メチルベンズチアゾリノンヒドラゾン(S M B T H)等も使用できる。このような発色性基質の中でも、特に好ましくは、前述のように、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミンナトリウムである。

## 【0063】

前記酸化還元反応は、通常、緩衝液中で行われ、その条件は、前記生成した過酸化水素の濃度等により適宜決定される。通常、反応液中のP O D濃度10~20, 000 I U/リットル、発色性基質濃度0.001~1 mm o 1/1、反応温度20~37°C、反応時間1~5分、p H 6~9である。また、前記緩衝液は、特に制限されず、例えば、前記プロテアーゼ処理およびF A O D処理等と同様の緩衝液等が使用できる。

## 【0064】

前記酸化還元反応において、例えば、前記発色性基質を用いた場合、前記反応液の発色程度(吸光度)を分光光度計で測定することにより、過酸化水素の量を測定できる。そして、この過酸化水素濃度と検量線等とを用いて、試料中の糖化タンパク質量を求めることができる。

## 【0065】

なお、前記過酸化水素量は、前記P O D等を用いた酵素的手法の他に、例えば、電気的手法により測定することもできる。

## 【0066】

このような本発明の測定方法によれば、前述のように迅速に測定を行うことができる。また、従来法では、プロテアーゼ処理を短時間にすると、測定精度が低下するおそれがあったが、本発明の測定方法によれば、短時間でも優れた精度で測定できる。

## 【0067】

なお、本発明のタンパク質の分解方法においても、スルホン酸化合物およびニトロ化合物の共存下でプロテアーゼ処理を行うことが好ましい。また、上述の本発明の測定方法における糖化タンパク質の分解と同様の条件によって、タンパク質を分解できる。

## 【0068】

## 【実施例】

つぎに、実施例について比較例と併せて説明する。

## 【0069】

## (実施例1、比較例1)

この実施例は、スルホン酸化合物存在下で糖化ヘモグロビンをプロテアーゼ処理し、その分解物の糖化程度を、発色基質TPM-PSを用いて測定した例である。以下に、使用した試料、試薬および方法を示す。

## 【0070】

## (測定試料の調製)

ヘモグロビン凍結晶を精製水で溶解し、ヘモグロビン濃度50g/LでありHbA1c濃度6.5%のヘモグロビン溶液(HbA1c:Low)と、ヘモグロビン濃度50g/LでありHbA1c濃度11.5%のヘモグロビン溶液(HbA1c:High)とを調製した。そして、これらの各ヘモグロビン溶液60μLと精製水240μLとを混合して、HbA1c濃度6.5%の試料(以下、「試料Low」という)とHbA1c濃度11.5%の試料(以下、「試料High」という)とを調製した。

## 【0071】

## (第1試薬)

スルホン酸化合物

6.4 mM

界面活性剤 (ポリオキシエチレン(9)ドテシルエーテル)

1. 85 g/L

CHES-CHES・Na緩衝液 (pH9.4)

40 mM

MOPS-MOPS・Na緩衝液 (pH9.4)

15 mM

## 【0072】

前記第1試薬のスルホン酸化合物としては、SLS (カーテン社製) を使用した。

## 【0073】

## (第2試薬)

メタロプロテアーゼ (アークレイ社製)

2. 0 MU/L

CaCl<sub>2</sub>

2. 5 mM

NaCl

50 mM

MOPS-MOPS・Na緩衝液 (pH6.5)

1. 0 mM

## 【0074】

## (第3試薬)

FAOD (アークレイ社製)

18 KU/L

POD (キッコーマン社製)

67 KU/L

TPM-PS (同仁化学社製)

0. 25 mM

Tris-HCl緩衝液 (pH7.0)

300 mM

## 【0075】

## (方法)

前記試料Lowおよび試料Highのそれぞれについて測定を行った。まず、前記測定試料0.14 μLに前記第1試薬8.26 μLを添加した後、さらに、前記第2試薬75.6 μLを混合して、37°Cで5分間放置した。そして、この混合液に前記第3試薬18.9 μLを混合し、37°Cでインキュベートして発色反応を行った。そして、5分後の吸光度を商品名JCA-BM8 (日本電子社製) で測定した。測定波長は、主波長571 nm、副波長805 nmとした。一方、比較例としては、第1試薬のスルホン酸化合物を添加していない以外は、前記実施例と同様にして吸光度の測定を行った。なお、試料に第1試薬および第2試薬を混合した時点での、試料1 μLに対するスルホン酸化合物の添加量は、0.378 μL

mo1であった。

## 【0076】

(表1)

スルホン酸化合物 (mM)	ニトロ化合物 (mM)	吸光度		
		試料High (mAbs)	試料Low (mAbs)	High-Low (mAbs)
実施例1 SLS (6.4)	—	51.0	34.0	17.0
比較例1	—	16.7	16.0	0.7

## 【0077】

前記表1に示すように、実施例1によれば、試料Highの吸光度および試料Lowの吸光度は、それぞれ比較例よりも高い値が得られた。これは、スルホン酸化合物の存在下でプロテアーゼ処理することによって、糖化ヘモグロビンの分解が促進されたため、糖化部分に対して、FAODが作用し易くなつたからである。つまり、実施例によれば、分解の促進によって、FAODが比較例よりも多くの糖化部分に作用し易くなつたため、測定精度が向上したといえる。

## 【0078】

また、実施例によれば、試料Highの吸光度と試料Lowの吸光度との差は、比較例よりも高い値が得られた。前記試料Highは、同じヘモグロビン濃度であつても、試料Lowに比べてHbA1c濃度が大きい。つまり、ヘモグロビンの糖化量が大きいため、試料Highの吸光度は、理論上、HbA1c濃度に比例して、試料Lowの吸光度よりも大きな値となる。しかし、比較例によると、スルホン酸化合物非存在下でプロテアーゼ処理しており、糖化ヘモグロビンが分解され難いため、試料のHbA1c濃度が異なるにも拘わらず、試料Highと試料Lowとの吸光度差が7.1mAbsと低い値であった。これに対して、スルホン酸化合物存在下でプロテアーゼ処理した実施例によれば、試料Highと試料Lowとの吸光度差が比較例に比べて約2倍～3倍に増加した。このことからも、前述と同様の理由により、実施例の方法により測定精度が向上したといえる。

## 【0079】

## (実施例2)

この実施例は、スルホン酸化合物存在下で糖化ヘモグロビンをプロテアーゼ処理し、その分解物の糖化程度を、発色基質DA-64を用いて測定した例である。以下に、使用した試料、試薬および方法を示す。

## 【0080】

## (第1試薬)

スルホン酸化合物 (SLS: ナカライテスク社製)	6. 4 mM
界面活性剤 (ポリオキシエチレン(9)ラウリルエーテル)	1. 85 g/L
CHES-CHES・Na緩衝液 (pH9.4)	4.0 mM
MOPS-MOPS・Na緩衝液 (pH9.4)	1.5 mM

## 【0081】

## (第2試薬)

ニトロ化合物	0. 9 mM 又は 1. 8 mM
メタロプロテアーゼ (アークレイ社製)	2. 0 MU/L
CaCl <sub>2</sub>	2. 5 mM
NaCl	5.0 mM
MOPS-MOPS・Na緩衝液 (pH6.5)	1. 0 mM

## 【0082】

前記ニトロ化合物としては、2,4-DNA (和光純薬工業社製)、p-NA (和光純薬工業社製)、p-NP (和光純薬工業社製)、NaNO<sub>2</sub> (ナカライテスク社製)、2,4-DNH (和光純薬工業社製) をそれぞれ使用した。なお、ニトロ化合物を二種類添加する場合は、それぞれの濃度を0. 9 mMとし、合計1. 8 mMとした。

## 【0083】

## (第3試薬)

F A O D (アークレイ社製)	1.8 KU/L
P O D (キッコーマン社製)	6.7 KU/L
DA-64 (和光純薬工業社製)	7.0 μM
Tris-HCl緩衝液 (pH7.0)	3.00 mM

## 【0084】

## (方法)

前記実施例1で調製した試料Lowおよび試料Highのそれぞれについて測定を行った。測定試料0.14 μLに前記第1試薬8.26 μLを添加した後、さらに、前記第2試薬75.6 μLを混合して、37℃で5分間放置した。そして、この混合液に前記第3試薬18.9 μLを混合し、37℃でインキュベートして発色反応を行った。そして、5分後の吸光度を商品名JCA-BM8（日本電子社製）で測定した。測定波長は、主波長751 nm、副波長805 nmとした。一方、比較例2としては、第1試薬のスルホン酸化合物、第2試薬のニトロ化合物を添加していない以外は、前記実施例と同様にして吸光度の測定を行った。これらの結果を下記表2に示す。なお、下記表2において「High-Low(mAbs)」は、試料Highの吸光度から試料Lowの吸光度を引いた値である。

## 【0085】

(表2)

	スルホン酸化合物 (mM)	ニトロ化合物 (mM)	吸光度		
			試料High (mAbs)	試料Low (mAbs)	High-Low (mAbs)
<b>実施例</b>					
2-1	SLS (6.4)	2,4-DNA (0.9)	4.2	1.6	2.6
2-2	SLS (6.4)	p-NA (0.9)	2.6	1.2	1.4
2-3	SLS (6.4)	p-NP (0.9)	3.2	1.6	1.6
2-4	SLS (6.4)	NaNO <sub>2</sub> (0.9)	2.3	1.3	1.0
2-5	SLS (6.4)	2,4-DNA (0.9)	3.5	1.6	1.9
		p-NA (0.9)			
2-6	SLS (6.4)	2,4-DNA (0.9)	2.8	1.1	1.7
		p-NA (0.9)			
2-7	SLS (6.4)	p-NP (0.9)	3.3	1.3	2.0
		p-NA (0.9)			
2-8	SLS (6.4)	2,4-DNA (0.9)	4.0	1.9	2.1
		NaN <sub>3</sub> (0.9)			

## 比較例

2	—	—	1.1	0.9	0.2
---	---	---	-----	-----	-----

## 【0086】

前記表2に示すように、実施例2によれば、実施例1と同様に、試料Highの吸光度および試料Lowの吸光度は、それぞれ比較例よりも高い値が得られた。また、試料Highの吸光度と試料Lowの吸光度との差も、比較例2よりも高い値が得られた。以上のことから、前記実施例1と同様に、スルホン酸化合物およびニトロ化合物存在下でプロテアーゼ処理することによって、糖化ヘモグロビンの分解が促進され、これによって測定精度が向上したといえる。

## 【0087】

## 【発明の効果】

以上のように、本発明の測定方法は、前記スルホン酸化合物の存在下でプロテアーゼ処理を行うことによって、短時間でタンパク質等を分解できるため、迅速に糖化タンパク質等の測定を行うことが可能である。このため、よりいっそう高精度な測定を実現でき、本発明の測定方法は、前述のような臨床医療等における各種検査に有用である。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 試料中の糖化タンパク質を酸化還元反応を用いて測定する方法であ  
って、信頼性に優れる測定値が得られる測定方法を提供する。

【解決手段】 糖化タンパク質を含む試料をスルホン酸化合物の存在下におい  
てプロテアーゼ処理することによって、前記糖化タンパク質を分解し、得られた  
糖化タンパク質分解物の糖化部分とフルクトシルアミノ酸オキシダーゼとを反応  
させ、この酸化還元反応を測定することによって、前記糖化タンパク質の量を測  
定する。スルホン酸化合物としては、ラウリル硫酸ナトリウムが使用できる。

【選択図】 なし

出願人履歴情報

識別番号 [000141897]

1. 変更年月日 2000年 6月12日

[変更理由] 名称変更

住 所 京都府京都市南区東九条西明田町57番地

氏 名 アークレイ株式会社